

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36086 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: **B01J 19/00**, (74) Anwalt: **WEICKMANN, H.**; Kopernikusstrasse 9, 81679 Munich (DE).
C07B 61/00, C07K 1/04, C07H 21/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/11476** (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. November 2000 (17.11.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 55 361.0 17. November 1999 (17.11.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH** [DE/DE]; Käfertalerstrasse 190, 68167 Mannheim (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **STÄHLER, Peer** [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, 68169 Mannheim (DE). **SCHEFFLER, Matthias** [DE/DE]; Stahlbühlring 77, 68357 Ladenburg (DE). **KIESEWETTER, Stefan** [DE/DE]; Kurfürstenallee 3, 69181 Leimen (DE). **GÜTMIL, Ramon** [CU/DE]; Otto-Hahn-Platz 7, 69126 Heidelberg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/36086 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FINISHED CHEMICAL SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG KONFEKTIONIERTER CHEMISCHER OBERFLÄCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a programmable automated method for producing finished chemical surfaces with the combinatorial use of specific synthesis modules (modular building block system) by effecting an *in situ* synthesis on a reaction support.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein programmierbares, automatisiertes Verfahren zur Herstellung von konfektionierten chemischen Oberflächen unter kombinatorischer Verwendung spezifischer Synthesemodule ("Baukastensystem") durch *in situ* Synthese an einem Reaktionsträger.

Verfahren zur Herstellung konfektionierter chemischer Oberflächen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein programmierbares, automatisiertes Verfahren zur Herstellung von konfektionierten chemischen Oberflächen unter kombinatorischer Verwendung spezifischer Synthesemodule durch *in situ* Synthese auf einem Träger. Wichtige Anwendungsgebiete des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die molekulare Diagnostik in den Bereichen Human- und Veterinärmedizin (Infektionsdiagnostik, Onkologie, Forensik), die Entwicklung neuer pharmazeutisch wirksamer Substanzen, die biologische Grundlagenforschung, die Lebensmittelanalytik, die Biotechnologie, insbesondere in den Bereichen Stoffproduktion und Umweltanalytik, sowie Hochdurchsatzverfahren zum Wirkstoffscreening in kombinatorisch-chemischen Untersuchungen.

15

Automatisierte Systeme, die eine schnelle, gezielte und exakte Erfassung und Analyse chemischer und/oder biologischer Informationen erlauben, sind beispielsweise in den Biowissenschaften und angrenzenden Fachgebieten, wie der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung und der medizinischen Diagnostik, unverzichtbare Hilfsmittel.

20

Ein leistungsfähiges System zur Erfassung und Analyse von großen Informationsmengen, wie sie bei der Erfassung genetischer Informationen oder der Analyse von Produkten der kombinatorischen Chemie anfallen, sind fluidische Mikroprozessoren. Darunter versteht man miniaturisierte, hybride Funktionselemente mit chemischen und technischen Komponenten, z.B. einen Reaktionsträger, an dessen Oberfläche Rezeptoren, z.B. Biomoleküle immobilisiert sind, die als spezifische Interaktionspartner für entsprechende Analyten dienen. Da tausende potentielle biologische und biochemische Interaktionspartner in einem Reaktionsträger angeordnet sein

25

30

- 2 -

können, müssen diese mit mikrotechnischen Methoden aufgebracht werden.

5 Nach dem derzeitigem Stand der Technik werden die Rezeptoren durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen immobilisiert oder in situ auf der Festphase synthetisiert. Eine Modulierung der physikalischen (z.B. Dotierungsdichte), physikalisch-chemischen (z.B. Redoxpotential), chemischen (z.B. katalytische Aktivität) und gegebenenfalls biokompatiblen Eigenschaften (z.B. Steuerung molekularer Erkennungsprozesse) der
10 hergestellten Oberflächen ist experimentell sehr aufwendig und gelingt nicht immer. Optimierungen chemischer, biologischer und biochemischer Interaktionen, die an Oberflächen nachgewiesen werden sollen, sind daher nur unter erheblichem Arbeits- und Zeitaufwand, wenn überhaupt, zu erreichen. Da als Interaktionspartner Naturstoffe wie DNA, RNA, PNA,
15 Oligonukleotide, Saccharide, Kohlenhydrate, Peptide, Proteine, aber auch Derivate der kombinatorischen Chemie in Frage kommen, ist die Bandbreite optimal geeigneter Oberflächenkonfigurationen sehr groß und bislang weder analytisch, noch synthetisch ausreichend systematisch erfaßt.

20 Die Bausteine eines chemischen Polymerisationsprozesses werden generell als "Synthone" bezeichnet. Die funktionellen Gruppen eines Synthons erlauben eine zielgerichtete chemische Reaktion mit geeigneten anderen funktionellen Gruppen an einem zweiten Synthon. In aller Regel sind diese reaktiven Zentren durch sogenannte Schutzgruppen maskiert, die in einer
25 geeigneten chemischen Umgebung gezielt entfernt werden können, wodurch eine Steuerung des Syntheseprozesses möglich wird, da nur solche funktionellen Gruppen umgesetzt werden, die keine Schutzgruppe tragen. Abhängig von der jeweiligen Synthesestrategie können Schutzgruppen im allgemeinen durch eine Änderung chemischer oder
30 physikochemischer Umgebungsparameter wie dem Redoxpotential, dem pH-Wert oder der Temperatur, aber auch durch den Eintrag

- 3 -

elektromagnetischer Energie, z.B. durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, entfernt werden.

Für die sequenzspezifische Synthese von Oligomeren, wie
5 Oligonukleotiden, Oligonukleotidderivaten, Peptiden, oder Kohlenhydraten,
die aus unterschiedlichen, jedoch endlich vielen Monomereinheiten
aufgebaut sind, hat sich die von Merryfield eingeführte, sequentielle
Polymerisation durch Kondensation an einer festen Phase bewährt (R.B.
Merryfield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154; R.B. Merryfield
10 (1965) Science 150: 179-185). Die Synthese nach Merryfield beginnt an
einem trägergebundenen Startmonomer, das durch die Entfernung einer
oder mehrerer Schutzgruppen aktiviert werden kann. Dadurch wird die
Addition eines in Lösung zugeführten, nächsten Monomers gestattet, das
nach erfolgter Polymerisation durch Kondensation seinerseits als
15 Ausgangspunkt für einen weiteren Polymerisationsschritt zur Verfügung
steht. Die sukzessive Wiederholung von Aktivierung und nachfolgender
Polymerisation durch Kondensation führt schließlich zur Synthese des
gewünschten Oligomeren.

20 Als Trägermaterialien für Merryfield-Synthesen haben sich insbesondere
Glasoberflächen bewährt. Aber auch Silizium oder Metalle wie Gold,
hochvernetztes Polystyrol und andere Kunststoffe wie leitfähiges Polypyrrol
oder Copolymere wie N-Vinylpyrrolidon/N-Acryloxysuccinimid, sowie
"Naturstoffe" wie Papier (Cellulose) werden als Trägerstoffe verwendet.
25 Die Funktionalisierung der genannten Materialien erfolgt in der Regel nach
dem Fachmann bekannten, chemischen (z.B. Hydrierung mit nachfolgender
Substitution) (Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press
1992, eds. G.T. Hermason, A.K. Mallia, P.K. Smith) oder physikalischen
Standardverfahren (z.B. Plasmabeschichtung), bei denen das Ergebnis der
30 Funktionalisierungsreaktion empirisch eingestellt und überprüft wird. Der
Bereich zwischen den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des
Trägers und den eigentlichen, bindungsaktiven funktionellen Rezeptoren

- 4 -

(z.B. immobilisierte Biomoleküle) wird von sogenannten "Linkern" überbrückt. Dabei handelt es sich um beliebig modifizierte Molekülreste, die funktionelle Gruppen enthalten und über diese Gruppen Bindung von Rezeptoren (z.B. Biomoleküle wie Oligonukleotide oder Kohlenhydratreste) mit der Trägeroberfläche vermitteln. Die physiko-chemischen und die sterisch-räumlichen Eigenschaften des Linkers beeinflussen sowohl die an ihnen ausgeführten Merryfield-Synthesen (J. Katzhendler, S. Cohen, E. Rahmim, M. Weisz, I. Ringel, J. Deutsch (1989) Tetrahedron 45: 2777-2792; A.v. Aerschot, P. Hedeweijn, H. Vanderhaege (1988), Nucl. Nucl. 7: 75-90), als auch die Bindung des potentiellen Analyten an die hergestellte bindungsaktive Oberfläche (M. Beier, J.D. Hoheisel (1999) Nucleic Acids Res. 27: 970-1977). Die Auswahl und Varianz der verwendeten Linkerbausteine basiert in der Regel auf Erfahrungswerten und muß empirisch verifiziert werden.

Für eine Reihe trägergebundener, nukleinsäuregestützter Analysemethoden erfolgt die Detektion eines durch ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül markierten Analyten (z.B. einer DNA oder RNA) durch Hybridisierung an eine auf dem Träger vorgelegte Matrix aus vielen verschiedenen Oligonukleotiden. Erfahrungsgemäß hat dabei die Dichte der auf dem Träger vorgelegten Oligonukleotide einen maßgeblichen Einfluß auf die Stärke des meßbaren Signales und auf das Verhältnis von Signal zu Hintergrund. Erste Ansätze zur Optimierung der Trägeroberfläche für eine Verbesserung des Detektionsprozesses im Bereich DNA-DNA-Wechselwirkungen sind beschrieben. In einem Ansatz wurde die Chemie aus dem "Starburst"-Dendrimerbereich eingesetzt. Hierbei handelt es sich um stark verzweigte Strukturen, die generationsweise um einen Initiationspunkt aufgebaut werden. Mit zunehmender Generationszahl nimmt die Zahl der Verzweigungen und damit die Anzahl an Reaktionsorten zu, wodurch es schließlich zu einer Erhöhung der funktionellen Dichte auf der Oberfläche und mittelbar zu einer Verbesserung des Detektionsprozesses (M. Beier, J.D. Hoheisel (1999) Nucleic Acids Res. 27: 970-1977) kommt.

- 5 -

In einem anderen Ansatz wurden Aminosäuren in die Linkermoleküle integriert, um sowohl für den Synthese, als auch für den Detektionsprozeß (Hybridisierung), die Ladungsdichte auf der Oberfläche pH-abhängig steuern zu können, und so eine hochspezifische Hybridisierung mit dem Analyten zu gewährleisten (M.S. Shchepinov, S.C. Case-Green, E.M. Southern (1997) Nucleic Acid Res. 25: 1155-1161).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, bei dem die Einführung funktioneller Gruppen "in situ", also während des Funktionalisierungsprozesses, moduliert und dem Verwendungszweck der Oberfläche angepaßt werden kann. Eine weitere Aufgabe besteht darin, im Verfahren geeignete Linkermoleküle nach Art eines Baukastensystems aus einer vorgegebenen Anzahl von chemisch reaktiven Grundbausteinen auswählen und automatisiert kondensieren zu können. Weiterhin sollte das Fortschreiten und das Ergebnis der Synthesereaktion in einem Regelprozeß überwachbar und steuerbar sein.

Außerdem ist die zu lösende Aufgabe die Bereitstellung eines Verfahren, das bei der Synthese oder bei der Immobilisierung von bindungsaktiven Strukturelementen in oder auf einem Reaktionsträger in situ die flexible Einstellung der physikalischen (z.B. Dichte), der physikochemischen (z.B. Polarität), der chemischen (z.B. photochemische Labilität) und/oder der biokompatiblen (z.B. Steuerung molekularer Erkennungsprozesse) Eigenschaften erlaubt, unabhängig von der Vorgabe durch die primäre Funktionalisierung des Reaktionsträgers.

Diese Aufgabe wird gelöst durch den Aufbau eines Verbindungselementes ("Linker") zwischen einer funktionalisierten Festphasenoberfläche und den analytbindenden Strukturelementen (Rezeptoren). Der Linker wird im oder auf dem Reaktionsträger systematisch aus einem oder mehreren gleichen oder verschiedenen Monomeren diverser chemischer Substanzklassen nach Art einer Merryfield-Strategie aufgebaut, die sich im Sinne eines

- 6 -

Baukastenprinzips frei kombinieren lassen. Zur genauen Einstellung der physikalischen, physikochemischen, chemischen und biokompatiblen Eigenschaften der entstehenden aktiven Oberfläche kann eine Steuerung durch einen IST-Wert / ZIEL-Wert Abgleich über eine oder mehrere im oder
5 am Reaktionsträger implementierte Meßzelle(n) erfolgen, die einen frei wählbaren, maßgerechten und reproduzierbaren Aufbau der Linker aus den vorgegebenen Monomereinheiten gestattet.

Im Gegensatz zum Stand der Technik, wo Oberflächeneigenschaften
10 lediglich durch Versuch und Irrtum eingestellt und modifiziert werden können, kann mit Hilfe der Erfindung automatisiert und reproduzierbar eine konfektionierte chemische Oberfläche programmiert aufgebaut werden.

In einem ersten Aspekt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur
15 Herstellung eines beschichteten Trägers die Schritte

- a) Bereitstellen eines Trägers, der an seiner Oberfläche reaktive Gruppen aufweist, und
 - b) Aufbauen einer funktionalisierten Oberfläche auf dem Träger durch schrittweise Synthese von Linkermolekülen, die funktionelle
20 Gruppen enthalten, aus Synthon-Bausteinen,
- wobei der Syntheseprozess der Linkermoleküle überwacht und gegebenenfalls moduliert wird.

Zur Überwachung des Syntheseprozesses werden vorzugsweise für einen
25 oder mehrere physikalisch-chemische Parameter der funktionalisierten Oberfläche ZIEL-Werte vorgegeben, und während der Synthese erfolgt ein Abgleich von gemessenen IST-Werten mit den vorgegebenen ZIEL-Werten des oder der Parameter. Abhängig vom Ergebnis des Abgleichs von IST- und ZIEL-Werten können nachfolgende Syntheseschritte moduliert werden.
30 Die Überwachung kann nach jeweils einem oder mehreren Syntheseschritten erfolgen. Vorzugsweise wird nach jedem Syntheseschritt

- 7 -

eine Überwachung durchgeführt. ZIEL-Werte können z.B. vom Experimentator in Abhängigkeit von der Anwendung vorgegeben werden.

Der letzte IST-Wert, der im Idealfall dem jeweils voreingestellten ZIEL-Wert entspricht, kann als IST-Wert für die sich anschließende Kopplung des
5 bindungsaktiven Elements, bzw. Rezeptors an den Linker oder/und als interner Standard für die Qualitätssicherung berücksichtigt werden. Für eine spätere qualitative oder/und quantitative Erfassung des Signals einer chemischen, biochemischen oder biologischen Reaktion an den bindungs-
10 aktiven Elementen sind die Oberflächeneigenschaften des Reaktionsträgers in jedem Experiment bekannt und können als Parameter in die Analysen einfließen.

Als Messmethoden zur Überwachung kommen beispielsweise in Betracht:
15 Absorption, Emission, Leitfähigkeit, pH-Wert, NMR, Massenspektrometrie, Radioaktivität, Plasmonenresonanz, Lichtbrechung, Lichtstreuung, Wärmestönung, Elektronenbeugung, Neutronenbeugung oder Ellipsometrie. Die Messung erfolgt in einer Messzelle, die vorzugsweise in den Reaktionsträger selbst oder in die umgebenden fluidischen Elemente
20 integriert ist. Bei fluidisch getrennten Reaktionsräumen innerhalb des Reaktionsträgers erfolgt die Messung vorzugsweise nach Reaktionsräumen getrennt. Bevorzugte ZIEL-Werte bzw. physikalisch-chemische Parameter, die überwacht werden können, sind z.B. die Dichte funktioneller Gruppen auf der Oberfläche, der Abstand funktioneller Gruppen von der Oberfläche,
25 die Oberflächenpolarität, optische, magnetische, elektronische, dielektrische und katalytische Eigenschaften, die thermische Stabilität, die photochemische und enzymatische Aktivität aber auch räumlich strukturelle Eigenschaften (molekulare Erkennung).

30 In einem weiteren Aspekt betrifft das erfindungsgemäße Verfahren den Einsatz von Synthon-Bausteinen, die der Modellierung konfektionierter chemischer Oberflächen dienen. Dabei kommen eine Reihe von Bausteinen

zum Einsatz, die sich unterschiedlichen chemischen Verbindungsklassen, wie etwa Aminosäuren, Nukleosiden, Glykosiden, zuordnen lassen. Üblicher-weise werden solche Synthon-Bausteine in schutzgruppen-modifizierter Form eingesetzt. Entsprechend ihren chemischen, physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften können diese Bausteine verschiedene Funktionen zur Konfektionierung der Oberfläche übernehmen: Abstandshalter ("Spacer") wie Alkylreste, dienen der Variation des vertikalen Abstandes zwischen funktionalisiertem Trägermaterial und bindungsaktivem Element. Abstandshalter mit sterisch anspruchsvollen Gruppen können zur Variation der Raumerfüllung, d.h. des horizontalen Abstandes zwischen einzelnen Linkermolekülen bindungsaktiven Elementen ("Spacern") verwendet werden. Bei Einführung polarer oder geladener Reste in die Abstandshalter (z.B. Verwendung von Oligoethylenglycol anstelle von Alkylresten) kann die Polarität der Oberfläche moduliert werden. Dielektrische Eigenschaften können beispielsweise durch Einführung von geladenen Gruppen, z.B. Aminosäureresten in den Linker variiert werden.

Die Bausteine können also beispielsweise ausgewählt werden aus Synthonen der Nukleinsäure-, Peptid- oder Kohlenhydratchemie oder/und aus Spacermolekülen.

Die auf dem Träger synthetisierten Linkermoleküle enthalten funktionelle Gruppen, die die Kopplung weiterer Linker-Synthon-Bausteine oder - nach Beendigung der Linkersynthese - von Rezeptoren oder Rezeptorbausteinen ermöglicht. Die funktionellen Gruppen der Linkermoleküle können beispielsweise ausgewählt werden aus -OR, -NR₂, -SR, -PO₃R₂, -CN, -SCN, -COR' und -OCOR', worin R H oder eine Schutzgruppe bedeutet und R' H oder eine Schutzgruppe oder -OR, -NR₂ oder -SR bedeutet. Weiterhin können R und R' für Alkyl, Aryl, Alkenyl und/oder Allylreste und/oder weitere nützliche organische Reste stehen.

Nach beendeter Linkersynthese erfolgt die Kopplung von Rezeptoren, die ebenfalls durch schrittweise Synthese aus Synthese-Bausteinen je nach verwendeter Synthesestrategie, z.B. Peptid-, Oligonukleotid- oder Kohlenhydratsynthese an der Festphase oder durch ortsspezifische und/oder nichtortsspezifische Immobilisierung von kompletten Rezeptoren
5 erfolgen kann.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung den Einsatz von Dotierungs-Synthonen zur chemischen und physikochemischen, aber auch zur biokompatiblen Modulation der
10 Oberflächeneigenschaften. Hierbei handelt es sich einerseits um verzweigte Synthone, deren Einkopplung zu einer Vervielfachung der Zahl initialer Reaktionsorte führt (Signalamplifikation) und um Blind-Synthone, die zu einer Verringerung der Reaktionsorte führen, da sie selbst keine funktionellen Gruppen tragen (Signalreduktion). Alle Synthone zeichnen
15 sich dadurch aus, dass sie im Sinne einer Merryfield-Synthese einsetzbar sind, d.h., die funktionellen Gruppen der Synthone tragen Schutzgruppen, die unter geeigneten chemischen oder physikalischen Bedingungen selektiv entfernt werden können. Die Einstellung der Oberflächeneigenschaften erfolgt durch Polymerisation, z.B. durch Kondensation einer geeigneten
20 Kombination von Abstandshaltern und Dotierungs-Synthonen. Durch Auswahl von geeigneten Dotierungs-Synthonen wird die Oberflächeneigenschaft moduliert, indem nach jedem Polymerisationsschritt der IST-Wert mit dem ZIEL-Wert verglichen wird, und vom System solange
25 geeignete Synthone oder Mischungen aus geeigneten Synthonen zugeführt werden, bis die Oberfläche die gewünschten Eigenschaften aufweist.

Die erste Addition von Spacer- oder Dotierungs-Synthone kann gefolgt sein von einem Blockierungsschritt, bei dem alle nicht verwendeten
30 funktionellen Gruppen der Oberfläche inaktiviert werden. Im Falle von Glasoberflächen geschieht dies vorzugsweise mit Hexamethyldisilazan, Triisobutylchlorsilan oder Trimethylchlorsilan. Dann wird die Schutzgruppe

- 10 -

von diesem ersten Synthon an der Oberfläche des Reaktionsträgers selektiv entfernt. Anschließend werden entsprechend dem Ergebnis einer Überwachung der Oberflächeneigenschaften - ein zweiter oder weitere Syntheseschritte mit einer gegebenenfalls modulierten Auswahl von Synthon-Bausteinen hinsichtlich der Anteile an Blind- oder/und Verzweigungs-Synthonen durchgeführt, wobei auch die Länge, die Raumerfüllung oder/und die Polarität der Synthone variiert werden können. Zusätzlich oder alternativ können die Synthonmenge oder/und -konzentrationen oder auch die Reaktionsbedingungen für einzelne oder mehrere Syntheseschritte variiert werden.

Vorzugsweise erfolgt der Syntheseprozess automatisiert und die Einstellung eines Eigenschaftsprofils der funktionalisierten Oberfläche ist programmierbar.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft das erfindungsgemäße Verfahren den ortsspezifischen Aufbau der funktionalisierten Oberfläche auf dem Träger, d.h. die funktionalisierte Oberfläche erstreckt sich nicht über den gesamten Träger, sondern nur über vorbestimmte Oberflächenbereiche, wobei Array-Strukturen erzeugt werden können.

Der ortsspezifische Aufbau der Oberfläche kann durch räumlich oder/und zeitlich begrenzte Belichtung oder durch räumlich oder/und zeitlich begrenzte Fluidzufuhr erfolgen. Dabei können auch mindestens zwei unterschiedlich funktionalisierte Oberflächen auf einem Träger aufgebaut werden. Die Unterschiede zwischen einzelnen Oberflächenbereichen können dabei in der Art der funktionellen Gruppen oder/und in der Dichte der funktionellen Gruppen innerhalb einzelner Bereiche liegen.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist, dass die Kombination unterschiedlicher Syntheseverfahren, z.B. Peptidsynthese bzw. DNA-Synthese oder hybride Syntheseverfahren, unterschiedliche

Strategien zur Einstellung der Oberflächeneigenschaften erlaubt. Als eine Variante können auf einem Träger unterschiedliche Oberflächeneigenschaften realisiert werden. Bei Verwendung von ortsspezifischen Syntheseverfahren ist auch die Einstellung von ortsspezifisch unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften möglich. Ein solches Verfahren ist beispielsweise die lichtgesteuerte Synthese mit entsprechend photolabilen Schutzgruppen, die über eine geeignete Belichtungsmatrix (siehe z.B. PCT/EP99/06316 und PCT/EP99/06317, auf deren Offenbarung in diesem Zusammenhang ausdrücklich Bezug genommen wird) ortsspezifisch entfernt werden können.

Der Träger kann grundsätzlich beliebig ausgewählt werden, z.B. aus Partikeln, insbesondere magnetischen Partikeln, Mikrotiterplatten und mikrofluidischen Trägern (wie z.B. fluidischen Mikroprozessoren) und kann eine Oberfläche ausgewählt aus Glas, Metallen, Halbmetallen, Metalloxiden oder Kunststoff aufweisen. Besonders bevorzugt sind die in PCT/EP 99/06315 offenbarten Mikropartikel und die in PCT/EP 99/06316 und PCT/EP 99/06317 offenbarten Träger mit planaren bzw. mit Mikrokanälen (Querschnitt z.B. 10 -1000 μm) versehenen Oberflächen. Auf die Offenbarung der genannten Dokumente wird ausdrücklich Bezug genommen.

In einem weiteren Aspekt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren das Koppeln von Rezeptoren an die funktionellen Gruppen der Linkermoleküle, wobei das Koppeln der Rezeptoren durch schrittweise Synthese aus Synthon-Bausteinen erfolgen kann. Auch hierbei kann der Syntheseprozess der Rezeptoren überwacht und gegebenenfalls moduliert werden. Rezeptoren sind biologisch oder/und chemisch funktionelle Moleküle, die z.B. ausgewählt werden können aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge, Peptiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Alternativ können jedoch auch vorgefertigte Rezeptoren an die Linkermoleküle gekoppelt werden. Auch das Koppeln von Rezeptoren auf dem Träger kann ortsspezifisch erfolgen.

- 12 -

So können z.B. mindestens zwei bezüglich Rezeptorart bzw. Rezeptorsequenz oder/und Rezeptordichte unterschiedliche Rezeptorbereiche aufgebaut werden.

5 Ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellter Träger kann z.B. in einem Verfahren zur Bestimmung eines Analyten verwendet werden, gegebenenfalls in einer integrierten Vorrichtung zur Trägersynthese und Analytbestimmung wie in PCT/EP 99/06317 offenbart. Der
10 erfindungsgemäße Träger unterscheidet sich von bekannten Trägern durch seine für den jeweiligen Anwendungszweck optimierte Oberflächenbeschaffenheit und seine hohe Reproduzierbarkeit.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur gesteuerten Synthese von Verbindungselementen (Linkern) zwischen
15 reaktiven Gruppen auf der Trägeroberfläche und bindungsaktiven Rezeptoren. Diese Verbindungselemente sind modulare Kondensate aus mehreren gleichen oder verschiedenen Synthon-Bausteinen. Dabei kann die Synthese der Linkermoleküle auf der gesamten Oberfläche des Trägers erfolgen, oder aber ortsspezifisch an ausgewählten Reaktionsorten
20 stattfinden.

Die Vorrichtung zur gesteuerten Synthese von Verbindungselementen kann eine programmierbare Lichtquellenmatrix sein, die eine ortsspezifische lichtabhängige Synthese erlaubt. Eine andere Möglichkeit ist eine
25 Vorrichtung zur fluidischen Synthese, die eine gesteuerte Zuführung von Fluiden, und damit auch der Synthesereagenzien, erlaubt, und dies wahlweise nach Reaktionsbereichen getrennt oder einheitlich.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße
30 Vorrichtung zur Herstellung von beschichteten Trägern:

- a) mindestens einen Träger, der an seiner Oberfläche reaktive Gruppen aufweist,

- 13 -

- b) mehrere Reservoirs, die Lösungen mit Synthons-Bausteinen zur schrittweisen Synthese von Linkermolekülen enthalten,
- c) Mittel zur Zufuhr der Synthons-Baustein-Lösungen auf den Träger und zur Ableitung verbrauchter Lösungen vom Träger, z.B. Pumpen und Leitungen oder/und Kapillaren,
- 5 d) Mittel zum Überwachen des Syntheseprozesses für die Linkermoleküle, z.B. Meßzellen oder -elemente zur Bestimmung eines oder mehrerer physikalisch-chemischer Parameter,
- e) Mittel zum Modulieren des Syntheseprozesses für die Linkermoleküle, z.B. eine entsprechende Software zum Abgleich der
- 10 IST-Werte für einen oder mehrere Parameter mit vorbestimmten ZIEL-Werten,
- f) gegebenenfalls Mittel zum Koppeln von Rezeptoren an Linkermoleküle auf der Trägersoberfläche und
- 15 g) gegebenenfalls Mittel zur Durchführung einer Analytbestimmung auf dem Träger, z.B. Mittel zur Zufuhr einer Probe und zur Messung eines durch den Analyten hervorgerufenen Signals.

Die folgenden Figuren und Ausführungsbeispiele sind zur Erläuterung

20 gedacht und sollen den Schutzzumfang des erfindungsgemäßen Verfahrens in keiner Weise einschränken.

Es zeigen:

25 **Abbildung 1** ein Beispiel für ein trifunktionelles Linkermolekül, siehe z.B. Burmeister et al. (Tetrahedron Lett. 4995,3667-3668).

Abbildung 2 Beispiele für Fluoreszenzmoleküle auf Tritylbasis und

30

Abbildung 3 Beispiele für Fluoreszenzmoleküle auf Nitrobenzylbasis.

Beispiele

Auf einem Reaktionsträger, vorzugsweise einem fluidischen Mikroprozessor aus Glas, werden primäre Alkoholfunktionen eingeführt. Die Beschichtung erfolgt durch einen Prozeß, der aus zwei Teilschritten besteht. Nach einer
5 Aktivierung erfolgt eine mehrstündige Silanisierung durch Besspülen des Reaktionsträgers mit einer Lösung von 1 - 10 % Hydroxyalkyltriethoxysilan in einem Alkohol (v:v). Für die Durchführbarkeit des erfindungsmäßigen Verfahrens ist eine konstante reproduzierbare Beschichtung wichtig. Dies
10 kann mit verschiedenen Verfahren, wie z.B. mit Ellipsometrie, Glimmentladungsspektroskopie, Konduktometrie oder einer anderen geeigneten Analyse- methode, analysiert werden, die sich zum Teil auch für die Detektionsschritte während des Verfahrens eignen. Die entstehenden primären Alkoholfunktionen dienen u.a. als Ausgangspunkte für eine
15 trägergebundene Oligonukleotidsynthese nach der Phosphonat- bzw. Phosphoamiditmethode oder eine Peptidsynthese modifiziert nach Merryfield.

Als Zielvorgabe für eine konfektionierte chemische Oberfläche soll im
20 aufgeführten Beispiel der Abstand zwischen den OH-Funktionen auf der Oberfläche des fluidischen Mikroprozessors und einem nach der Phosphonat- bzw. Phosphoamiditmethode zu synthetisierenden DNA-Oligomer ("bindungsaktives Strukturelement") 50 Atome betragen. Die Stellplatzdichte dieser Oligonukleotide soll auf ca. 10 nmol/cm²,
25 die Polarität des Linkers auf eine mittlere Größe eingestellt werden.

Zur Erzeugung des IST-Wertes muß die Funktionalisierungsdichte auf der Oberfläche des fluidischen Mikroprozessors bestimmt werden. Dies geschieht vorzugsweise durch automatisierte Kopplung eines
30 fluoreszierenden dimethoxytrityl- oder eines photoaktiven nitrobenzylgeschützten Monomers aus der Phosphoamiditchemie an freie

primäre Alkohole. Prinzipiell kommen für die Einführung der Fluoreszenz verschiedene Ansätze in Frage:

Fluoreszenz auf Linkerbasis (Abb. 1):

5

Bei dieser Substanzklasse werden trifunktionale Linkermoleküle verwendet, an deren eine Funktionalität ein Farbstoff (Farb) und an deren andere eine Schutzgruppe (S_1) gekoppelt wurden.

- 10 Die Fluoreszenzfarbstoffe bleiben in diesem Fall während des gesamten Prozesses im System. Die eigentliche Oligonukleotidsynthese erfolgt nach Abspaltung der Schutzgruppe S_1 . Im Ausführungsbeispiel 3-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-1-O-(1-pyrenyl)-butyl-glycerin (Burmeister et al., supra) wurde Pyren als Farbstoff und Dimethoxytrityl (DMT) als Schutzgruppe S_1 genutzt.
- 15

Um Nebenreaktionen zurückzudrängen, ist bei Verwendung von Photoschutzgruppen für Position S_1 darauf zu achten, dass sich die Anregungswellenlängen für die Abspaltung der Schutzgruppe und die

20 Anregung der Fluoreszenz nicht überschneiden.

Fluoreszenz auf Tritylschutzgruppenbasis (Abb. 2):

- 25 Einführung der Fluoreszenz erfolgt einerseits durch Substitution der Phenylgruppe im 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMT-Cl) durch einen geeigneten Farbstoff, z.B. Pyren (Typ I) andererseits durch Substitution eines oder beider Methylgruppen der Methoxyfunktionalitäten, z.B. Pyrenbutanol (Typ II). Entscheidend ist die Fähigkeit, das bei der Abspaltung der Schutzgruppe entstehende Kation zu stabilisieren, nicht
- 30 verloren geht.

Vorteil dieser Methode ist es, dass sich die fluoreszierenden säurelabilen Tritylschutzgruppen ohne weiteres in die Standard-Oligonukleotidsynthese integrieren lassen.

5

Fluoreszenz auf Nitrobenzylschutzgruppenbasis (Abb. 3):

Neben den säurelabilen DMT-Schutzgruppen werden auch Strategien verwendet, die auf der Abspaltung photoaktiver Schutzgruppen basieren.

10 In der Regel handelt es sich dabei um Nitrobenzylderivate. Durch gezielte Inkooperation einer geeigneten fluorophoren Gruppe, wie etwa einer 7-(Dimethylamino)-cumarin-Gruppierung, lassen sich diese fluoreszierenden photolabilen Schutzgruppen in die Oligonukleotidsynthese integrieren.

15

Fluoreszenz auf Basis von Nanopartikeln:

Als weitere Quelle für Fluoreszenz dienen Goldpartikel. Werden diese reversibel immobilisierten Nanoteilchen unter einem bestimmten Winkel bestrahlt, treten Light Scattering Effekte auf.

20

Das Ausmaß der auftretenden Fluoreszenz gibt ein indirektes Maß für die Zahl der zugänglichen primären OH-Funktionen. Der gefundene Wert dient als IST-Wert für die Stellplatzdichte des gewünschten Linkers. Dieser IST-Wert wird mit dem Zielwert verglichen. Je nachdem, ob die Vorgabe über- oder unterschritten ist, wird im nächsten Kopplungsschritt ein geeignetes Monomer oder ein Gemisch aus geeigneten Monomeren appliziert (Eine Palette an Monomeren ist im System bevorratet. Die Reaktivitätsdaten der Monomere sind in einer elektronischen Datenbank enthalten.), vorzugsweise ein Gemisch aus einem Blindmonomer, z.B. Methoxy-[(2-
25 cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoamidit und einem fluoreszierenden Verzweigungsmonomer.
30

Wiederum wird eine Fluoreszenzmessung zur Bestimmung des neuen IST-Wertes herangezogen. Dieser Schritt wird sukzessive wiederholt, bis die gewünschte Funktionalisierungsdichte erreicht ist. Anschließend erfolgt die Einstellung des Abstandes zwischen der Trägeroberfläche und dem zu synthetisierenden DNA-Oligonukleotid durch die schrittweise Einkopplung von vorzugsweise kommerziell erhältlichen Spaceramiditen. Ist ein Abstand von z.B. 40 - 60, vorzugsweise ca. 50 Atomen, zur Trägeroberfläche realisiert, kann mit der automatisierten Synthese des gewünschten DNA-Oligonukleotids begonnen werden. Anstelle der Dimethoxytrityl geschützten Monomere können auch photolabile, z.B. mit 2-Nitrobenzyloxycarbonyl oder 2-Nitroethyloxycarbonyl geschützte Monomere eingesetzt werden. Bei Verwendung einer programmierbaren Lichtquellenmatrix zur Belichtung auf dem fluidischen Mikroprozessor, können so ortsspezifisch verschiedene Linkermoleküle aufgebaut werden. Vor allem im Falle der Nanopartikel stellt die Ellipsometrie eine weitere Methode zur Generierung von IST-Werten dar.

Alle aufgeführten Varianten, die auf Fluoreszenz beruhen, vereinigen in sich den Vorteil, dass sie die Justage des optischen Aufbaus in einem Trägersystem gemäß PCT/EP99/06317 erheblich vereinfachen, da die Fokussierung auf diskrete Schichten wesentlich genauer ist, als die Fokussierung auf eine diffuse fluoreszierende Lösung.

Als weitere Methode kann die UV/VIS-Absorption des Tritylkations ($\lambda = 498 \text{ nm}$) des gekoppelten Amidits (vorzugsweise 3-Dimethoxytrityloxypropyl-1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoamidit), nach erfolgter Entschützungsreaktion zur Ermittlung des IST-Werts herangezogen werden. Sie ist ein direktes Maß für die Zahl der zugänglichen primären OH-Funktionen. Der gefundene Wert dient als IST-Wert für die Stellplatzdichte des gewünschten Linkers. Dieser IST-Wert wird mit dem Zielwert (10 nmol/cm^2) verglichen. Je nachdem ob die Vorgabe über- oder unterschritten ist, wird im nächsten Kopplungsschritt ein geeignetes

Monomer oder ein Gemisch aus geeigneten Monomeren (eine Palette an Monomeren ist im System bevorratet, die Reaktivitätsdaten der Monomere sind in einer elektronischen Datenbank enthalten), vorzugsweise Methoxy-
5 [(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoamidit ("Blindmonomer") und (4,4'-Dimethoxytrityloxy)-1,1-bis-ethyl-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-
phosphoamidit ("Verzweigungsmonomer") appliziert. Wiederum wird die
Absorptionsmessung der Dimethoxytritylkationen zur Bestimmung des
neuen IST-Wertes herangezogen. Dieser Schritt wird sukzessive wiederholt,
bis die gewünschte Funktionalisierungsdichte erreicht ist. Anschließend
10 erfolgt die Einstellung des Abstandes zwischen der Trägeroberfläche und dem zu synthetisierenden DNA-Oligonukleotid durch die schrittweise Einkopplung von Spaceramiditen, vorzugsweise 3-Dimethoxytrityloxypropyl-1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoamidit bzw. zur Erhöhung der Polarität 9-Dimethoxytrityloxy-triethylenglycol,1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoamidit). Ist ein Abstand von 50 Atomen zur
15 Trägeroberfläche realisiert, kann mit der automatisierten Synthese des gewünschten DNA-Oligonukleotids begonnen werden.

20 Anstelle der Dimethoxytrityl-geschützten Monomere können auch photolabile, mit 2-Nitrobenzyloxycarbonyl oder 2-Nitroethyloxycarbonyl geschützte Monomere eingesetzt werden. Bei Verwendung einer programmierbaren Lichtquellenmatrix zur Belichtung auf dem fluidischen Mikroprozessor, können so ortsspezifisch verschiedene Linkermoleküle
25 aufgebaut werden.

Als eine alternative Ausführung wird der Linker gemäß oben beschriebenem Verfahren bereitgestellt. Anschließend dienen die Anlagerungsstellen in Form entschützter funktioneller Gruppen der Immobilisierung von fertigen
30 Polymersonden. Dabei kann eine orts aufgelöste Entschützung die entsprechend orts aufgelöste Immobilisierung gegebenenfalls unterschiedlicher Sonden ermöglichen.

In einer weiteren Ausführung wird die Schutzgruppentechnik für die orts aufgelöst unterschiedliche Dotierung der Oberfläche verwendet, so daß in unterschiedlichen Reaktionsbereichen unterschiedliche Konzentrationen bzw. Dichten gleicher oder verschiedener Polymersonden entstehen.

5

Dabei kann wiederum mit automatisierter Erfassung und Einstellung eine einheitliche definierte Dichte an Spacer-Molekülen bereitgestellt werden. Im Anschluß daran kann bei Verwendung einer orts aufgelösten Entfernung der Schutzgruppe eine Fraktion der Reaktionsbereiche aktiviert und eine 10 Polymersondensynthese begonnen werden. Für die Dichte der in diesen Reaktionsbereichen entstehenden Sonden kann das geeignete Gemisch von verlängerbaren, nicht verlängerbaren oder verzweigten Synthone wie beschrieben zugegeben werden. Polymersonden gleicher Sequenz, aber unterschiedlicher Dichte können in der Folge synthetisiert werden, indem 15 nun andere Reaktionsbereiche aktiviert und mit einem Gemisch in Kontakt gebracht werden, das die gleiche Art von Bausteinen enthält, aber eine andere Mischung der verlängerbaren, nicht-verlängerbaren oder verzweigten Synthone. Auf entsprechende Weise können auch Reaktionsbereiche mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen 20 Polymersonden hergestellt werden. Alternativ kann die Dichte der Sonden so eingestellt werden, indem bei bekannter Halbwertszeit $T_{1/2}$ einer Schutzgruppe die Exposition zum entschützenden Einfluß, z.B. einer Lichtquelle, so gewählt wird, daß nur ein definierter Anteil der Schutzgruppen entfernt wird und somit die Dichte der anschließend 25 hergestellten Polymersonden auf dem Reaktionsbereich eingestellt wird. Somit können bei orts aufgelöster Entschätzung, z.B. lichtabhängiger Entschätzung, Polymersonden gleicher oder verschiedener Sequenz an unterschiedlichen Orten mit unterschiedlicher Dichte synthetisiert werden. Dies kann unter anderem für quantitative Bestimmung des Meßsignals 30 ausgenutzt werden, z.B. indem die Dichte der Polymersonden die Anzahl der gebundenen Analytmoleküle und somit die Signalstärke beeinflusst.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines beschichteten Trägers,
5 umfassend die Schritte,
 - a) Bereitstellen eines Trägers, der an seiner Oberfläche reaktive Gruppen aufweist, und
 - b) Aufbauen einer funktionalisierten Oberfläche auf dem Träger durch schrittweise Synthese von Linkermolekülen, die
10 funktionelle Gruppen enthalten, aus Synthon-Bausteinen,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Syntheseprozess der Linkermoleküle überwacht und gegebenenfalls moduliert wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass für einen oder mehrere physikalisch-chemische Parameter der funktionalisierten Oberfläche ZIEL-Werte vorgegeben werden und dass während der Synthese ein Abgleich von gemessenen IST-
20 Werten mit den vorgegebenen ZIEL-Werten des oder der Parameter erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass abhängig vom Ergebnis des Abgleichs von IST- und ZIEL-Werten nachfolgende Syntheseschritte moduliert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass eine Überwachung nach jedem Syntheseschritt durchgeführt wird.

- 21 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die physikalisch-chemischen Parameter ausgewählt werden aus
der Dichte funktioneller Gruppen auf der Oberfläche, dem Abstand
5 funktioneller Gruppen von der Oberfläche, der Oberflächenpolarität,
optischen, magnetischen, elektronischen, dielektrischen und
katalytischen Eigenschaften, der thermischen Stabilität, der
photochemischen und enzymatischen Aktivität und räumlich
strukturellen Eigenschaften.
- 10 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Überwachung durch eine oder mehrere im oder am Träger
angebrachte Messzellen erfolgt.
- 15 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Überwachung durch Bestimmung von Absorption, Emission,
Leitfähigkeit, pH-Wert, NMR, Massenspektrometrie, Radioaktivität,
20 Plasmonenresonanz, Lichtbrechung, Lichtstreuung, Wärmetönung,
Elektronenbeugung, Neutronenbeugung oder Ellipsometrie erfolgt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass der Syntheseprozess automatisiert erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einstellung eines Eigenschaftsprofils der funktionalisierten
30 Oberfläche programmierbar ist.

- 22 -

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Modulation des Syntheseprozesses durch Modulation der
Auswahl von Synthon-Bausteinen für einen oder mehrere
5 Syntheseschritte erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Synthonmenge oder/und -konzentration für einen oder
mehrere Syntheseschritte variiert wird.
10
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Anteil an Blind- oder/und Verzweigungssynthonen für einen
oder mehrere Syntheseschritte variiert wird.
15
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-12,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Länge, die Raumerfüllung oder/und die Polarität von
Synthonen für einen oder mehrere Syntheseschritte variiert wird.
20
14. Verfahren nach einem Ansprüche 10-13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Reaktionsbedingungen für einen oder mehrere
25 Syntheseschritte variiert werden.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Aufbau der funktionalisierten Oberfläche auf dem Träger
ortsspezifisch erfolgt.
30

- 23 -

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass der ortsspezifische Aufbau der Oberfläche durch räumlich
oder/und zeitlich begrenzte Belichtung erfolgt.
- 5 17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass der ortsspezifische Aufbau der Oberfläche durch räumlich
oder/und zeitlich begrenzte Fluidzufuhr erfolgt.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15-17,
dadurch gekennzeichnet,
dass mindestens zwei unterschiedlich funktionalisierte
Oberflächenbereiche auf einem Träger aufgebaut werden.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass auf dem Träger Oberflächen aufgebaut werden, die sich
bezüglich der Art oder/und der Dichte der funktionellen Gruppen
20 innerhalb einzelner Bereiche unterscheiden.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Bausteine ausgewählt werden aus Synthonen der
25 Nukleinsäure-, Peptid- oder Kohlenhydratchemie.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Bausteine ausgewählt werden aus Spacermolekülen.
- 30

- 24 -

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Träger eine Oberfläche ausgewählt aus Glas, Metallen,
Halbmetallen, Metalloxiden oder Kunststoff aufweist.
- 5
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Träger ausgewählt wird aus Partikeln, insbesondere
magnetischen Partikeln, Mikrotiterplatten und mikrofluidischen
Trägern.
- 10
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die funktionellen Gruppen der Linkermoleküle ausgewählt
werden aus -OR, -NR₂, -SR, -PO₃R₂, -CN, -SCN, -COR' und -OCOR',
worin R H oder eine Schutzgruppe bedeutet und R' H oder eine
Schutzgruppe oder -OR, -NR₂ oder -SR bedeutet.
- 15
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
weiterhin umfassend
das Koppeln von Rezeptoren an die funktionellen Gruppen der
Linkermoleküle.
- 20
26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Koppeln durch schrittweise Synthese von Rezeptoren aus
Synthon-Bausteinen erfolgt.
- 25
27. Verfahren nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Syntheseprozess der Rezeptoren überwacht und
gegebenenfalls moduliert wird.
- 30

- 25 -

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24-27,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Rezeptoren ausgewählt werden aus Nukleinsäuren,
Nukleinsäureanaloga, Peptiden, Proteinen und Kohlenhydraten.
- 5
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Koppeln von Rezeptoren auf den Träger ortsspezifisch
erfolgt.
- 10
30. Verfahren nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet,
dass auf dem Träger mindestens zwei bezüglich der Art oder/und der
Dichte der Rezeptoren unterschiedliche Rezeptorbereiche aufgebaut
werden.
- 15
31. Verwendung eines nach einem der Ansprüche 1-30 hergestellten
Trägers in einem Verfahren zur Bestimmung eines Analyten.
- 20
32. Vorrichtung zur Herstellung von beschichteten Trägern, umfassend:
- a) mindestens einen Träger, der an seiner Oberfläche reaktive
Gruppen aufweist,
 - b) mehrere Reservoirs, die Lösungen mit Synthon-Bausteinen zur
schrittweisen Synthese von Linkermolekülen enthalten,
 - 25 c) Mittel zur Zufuhr der Synthon-Baustein-Lösungen auf den
Träger und zur Ableitung verbrauchter Lösungen vom Träger,
 - d) Mittel zum Überwachen des Syntheseprozesses für die
Linkermoleküle und
 - e) Mittel zum Modulieren des Syntheseprozesses für die
30 Linkermoleküle.

- 26 -

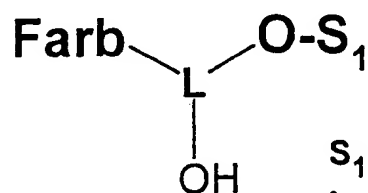
33. Vorrichtung nach Anspruch 32,
weiterhin umfassend

- f) Mittel zum Koppeln von Rezeptoren an Linkermoleküle auf der
Trägeroberfläche.

5

34. Vorrichtung nach Anspruch 32 oder 33,
weiterhin umfassend

- g) Mittel zur Durchführung einer Analytbestimmung auf dem
Träger.



S₁: Schutzgruppe, z.B. DMT, NPPOC

L: trifunktionelles Molekül z.B. Glycerin,
1,2,5-Trihydroxypentan

Farb.: beliebiger Fluoreszenz-Farbstoff, z.B. Pyren

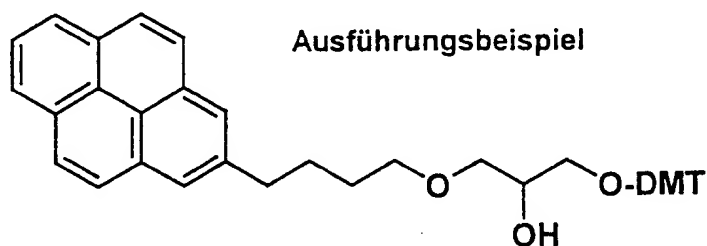
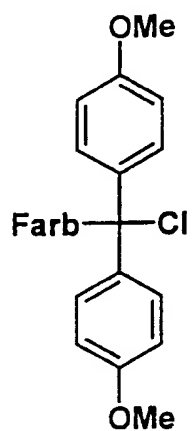


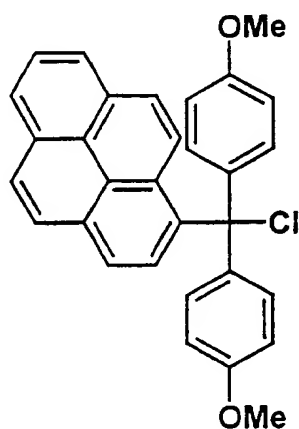
Abb. 1:

Abb. 2:

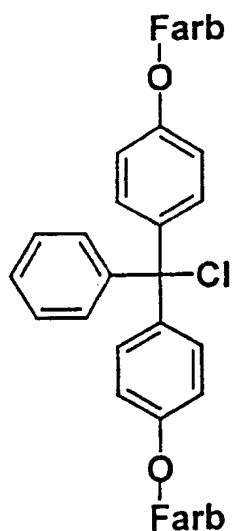
Typ I:



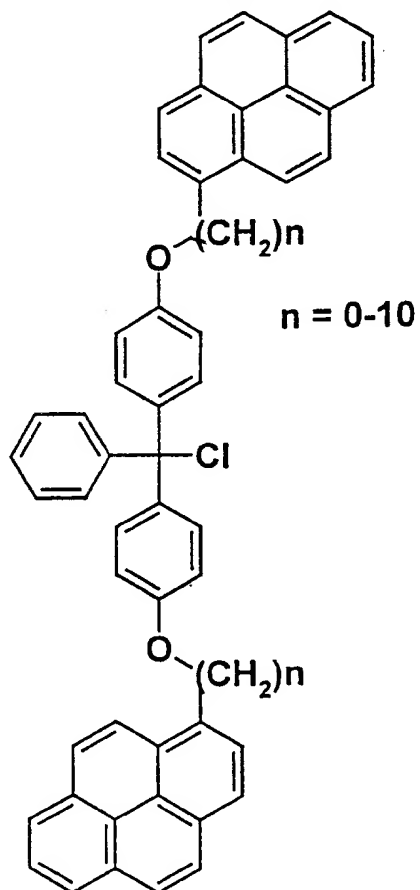
Beispiel



Typ II:



Beispiel



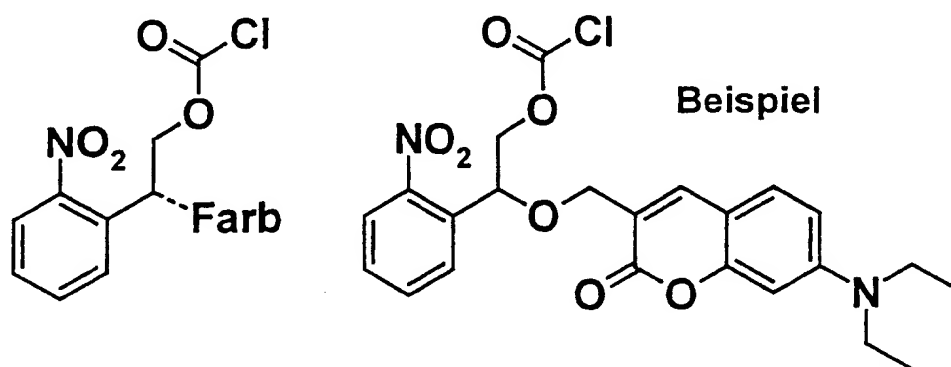


Abb. 3:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/11476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J19/00 C07B61/00 C07K1/04 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J C07K C07H C07B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 955 085 A (AFFYMETRIX, INC.) 10 November 1999 (1999-11-10) abstract page 2, line 44 - line 47 page 2, line 58 -page 3, line 4 page 4, line 21 -page 5, line 6 page 5, line 51 -page 6, line 45 page 9, line 22 - line 54 figures 3-5,13,14A,14B	1,2,5,8, 15,16, 18-20, 22,24-34
P,X	DE 198 42 164 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS) 6 April 2000 (2000-04-06) abstract column 1, line 30 -column 2, line 2 --- -/-	1,31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2001

Date of mailing of the international search report

03/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: .al Application No

PCT/EP 00/11476

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 99 39817 A (AFFYMETRIX, INC.) 12 August 1999 (1999-08-12) the whole document -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 00/11476

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 955085	A	10-11-1999	US 6130046 A JP 2000032998 A	10-10-2000 02-02-2000
DE 19842164	A	06-04-2000	AU 1260400 A WO 0015837 A	03-04-2000 23-03-2000
WO 9939817	A	12-08-1999	AU 2586799 A EP 1051245 A	23-08-1999 15-11-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/11476

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01J19/00 C07B61/00 C07K1/04 C07H21/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01J C07K C07H C07B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 955 085 A (AFFYMETRIX, INC.) 10. November 1999 (1999-11-10) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 44 - Zeile 47 Seite 2, Zeile 58 - Seite 3, Zeile 4 Seite 4, Zeile 21 - Seite 5, Zeile 6 Seite 5, Zeile 51 - Seite 6, Zeile 45 Seite 9, Zeile 22 - Zeile 54 Abbildungen 3-5, 13, 14A, 14B ---	1, 2, 5, 8, 15, 16, 18-20, 22, 24-34
P, X	DE 198 42 164 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS) 6. April 2000 (2000-04-06) Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 30 - Spalte 2, Zeile 2 --- -/-	1, 31



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. April 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/05/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11476

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 99 39817 A (AFFYMETRIX, INC.) 12. August 1999 (1999-08-12) das ganze Dokument -----</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/11476

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 955085 A	10-11-1999	US 6130046 A JP 2000032998 A	10-10-2000 02-02-2000
DE 19842164 A	06-04-2000	AU 1260400 A WO 0015837 A	03-04-2000 23-03-2000
WO 9939817 A	12-08-1999	AU 2586799 A EP 1051245 A	23-08-1999 15-11-2000